

ANALISIS AKTIVITI ENZIM DAN ELISA KE ATAS PENANDA BIOLOGI PERGERAKAN GIGI DALAM CECAIR KREVIS GINGIVA MANUSIA SEMASA RAWATAN ORTODONTIK

NURFATHIHA, A.K.¹, ROHAYA, M.A.W.^{2*}, SAHIDAN, S.¹, ABDUL AZIZ, J.³, INTAN ZARINA, Z.A.¹,
ZAIDAH, Z.A.⁴ dan SHAHRUL HISHAM, Z.A.¹

¹*Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Malaysia*

^{2*}*Jabatan Ortodontik, Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia,
50300 Kuala Lumpur, Malaysia*

³*DELTA, Pusat Pengajian Matematik, Fakulti Sains dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Malaysia*

⁴*Department of Microbiology, Faculty of Applied Science, Universiti Teknologi MARA,
40450, Shah Alam, Selangor, Malaysia*

*E-mel: shahroy7@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan kajian ini adalah untuk mengenalpasti perhubungan diantara aktiviti spesifik laktat dehidrogenase (LDH), aspartat aminotransferase (AST), asid fosfatase rintang tartrat (TRAP) dan alkali fosfatase (ALP) dengan jumlah enzim masing-masing yang hadir dalam cecair krevis gingiva (*gingiva crevicular fluid*; GCF) semasa rawatan ortodontik dengan menggunakan analisis statistik. Sampel GCF diambil daripada 19 orang subjek ortodontik pada masa-masa tertentu; sebelum memakai pendakap gigi (basal) dan selepas memakai pendakap gigi [minggu 0 (sebelum dikenakan tekanan) dan minggu 1 hingga minggu 5 (selepas daya diberikan)]. Subjek menerima daya 1.0 N dan 1.5 N sama ada di bahagian kanan atau kiri arkus maksila. Pengasaan enzim dan analisis ELISA dilakukan. Analisis korelasi *Pearson* menunjukkan tiada korelasi yang tinggi dan signifikan ($p > 0.05$) di antara jumlah enzim dengan aktiviti spesifik enzim semasa rawatan ortodontik pada kedua-dua daya (1.0 N dan 1.5 N) bagi kesemua enzim penanda yang dikaji; LDH (1.0 N, $r = -0.28$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = -0.08$, $p > 0.05$), AST (1.0 N, $r = -0.49$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = 0.08$, $p > 0.05$), TRAP (1.0 N, $r = 0.016$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = 0.48$, $p > 0.05$) dan ALP (1.0 N, $r = -0.28$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = -0.08$, $p > 0.05$). Oleh itu, asai enzim lebih sesuai digunakan berbanding analisis ELISA untuk melihat profil aktiviti enzim penanda yang aktif semasa rawatan ortodontik berdasarkan kepada proses pergerakan gigi yang melibatkan enzim aktif.

Kata kunci: Laktat dehidrogenase (LDH), aspartat aminotransferase (AST), asid fosfatase rintang tartrat (TRAP) dan alkali fosfatase (ALP)

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the correlation between lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (ALP) activity with total enzyme presence in gingiva crevicular fluid (GCF) during orthodontic treatment respectively using statistical analysis. GCF samples were collected from orthodontic subjects ($n=19$) that bonded with SLB at week 0 (before force application) and at week 1-5 (after force application). Subjects received 1.0 N and 1.5 N of force either on the right or left side of maxilla arch. Enzymes assay and ELISA analysis were conducted. Pearson correlation test showed that there were no strong correlation and significant ($p > 0.05$) between total enzyme and specific activity during orthodontic treatment for both forces used (1.0 N and 1.5 N) and for all enzymes markers studied; LDH (1.0 N, $r = -0.28$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = -0.08$, $p > 0.05$), AST (1.0 N, $r = -0.49$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = -0.08$, $p > 0.05$), TRAP (1.0 N, $r = 0.016$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = 0.48$, $p > 0.05$), ALP (1.0 N, $r = -0.28$, $p > 0.05$; 1.5 N, $r = -0.08$, $p > 0.05$). Therefore, enzyme activity approach is suitable compared to ELISA analysis to observe active biomarkers profiling during orthodontic tooth movement due to tooth movement process involved the role of enzymes active.

Key words: Lactate dehydrogenase (LDH), aspartate aminotransferase (AST), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), alkaline phosphatase (ALP)

* To whom correspondence should be addressed.

PENGENALAN

Rawatan ortodontik melibatkan proses permodelan berbalik struktur tisu ligamen periodontal (PDL) dan tulang alveolar (Krishnan dan Davidovitch, 2006). Proses permodelan berbalik ini terdiri daripada empat fasa iaitu pengaktifan, penyerapan tulang, pembalikan serta pembentukan tulang (Perinetti *et al.*, 2002). Proses-proses ini berlaku apabila daya ortodontik dikenakan ke atas gigi berpendakap semasa rawatan ortodontik (Krishnan dan Davidovitch, 2006). Menurut Sugiyama *et al.* (2002), pertukaran proses fisiologi pada PDL dan tulang alveolar akan merangsang sintesis pelbagai bahan pengantara termasuk enzim laktat dehidrogenase (LDH), aspartat aminotransferase (AST), asid fosfatase rintang tartrat (TRAP) dan alkali fosfatase (ALP).

LDH adalah enzim sitoplasmik yang dirembes keluar (ekstraselular) apabila berlaku kemusnahan pada tisu periodontal yang seterusnya menyebabkan inflamasi (Alfaqaeh dan Anil, 2011). AST pula adalah enzim intraselular yang dihasilkan semasa berlakunya kematian sel atau nekrosis (Paolantonio *et al.*, 2000). Selain itu, TRAP adalah isoenzim asid fosfatase yang umumnya dijumpai di dalam tulang dan memainkan peranan dalam penyerapan tulang (Bhosale *et al.*, 2011) manakala, ALP pula adalah enzim glikoprotein yang memainkan peranan dalam permineralan tulang (Stucki *et al.*, 2001). Kajian terdahulu telah menunjukkan TRAP berupaya bertindak sebagai penanda biologi untuk penyerapan tulang (Rohaya *et al.*, 2007), ALP untuk pembentukan tulang (Asma *et al.*, 2008), AST untuk kematian sel (Rohaya *et al.*, 2009) dan LDH untuk proses inflamasi (Shahrul Hisham *et al.*, 2010).

Pengasaan enzim telah digunakan dalam kajian-kajian untuk mengenalpasti profil penanda biologi pergerakan gigi semasa rawatan ortodontik daripada sampel GCF (Perinetti *et al.*, 2002; Rohaya *et al.*, 2008, Shahrul Hisham *et al.*, 2010; Batra *et al.*, 2006). Dalam kajian ini, selain daripada pengasaan enzim, analisis jumlah enzim penanda yang hadir juga dilakukan dengan menggunakan asai imunojerapan berpaut enzim (ELISA) kerana ELISA dipercayai merupakan kaedah yang sensitif dan boleh mengesan kehadiran protein serendah pg/mL (Yang dan Ma, 2009). Sehingga sekarang, tiada kajian pergerakan gigi yang menggunakan analisis ELISA untuk melihat profil enzim penanda daripada GCF semasa rawatan ortodontik. Perhubungan di antara aktiviti enzim dan jumlah protein yang hadir adalah penting untuk pembangunan alat diagnostik bagi mengawasi perkembangan proses yang berlaku semasa rawatan ortodontik. Oleh itu, kajian ini bertujuan untuk mengenalpasti korelasi diantara aktiviti spesifik enzim dengan jumlah protein yang

hadir dalam sampel GCF semasa rawatan ortodontik dengan menggunakan analisis statistik.

BAHAN DAN KAEDAH

Sampel kajian

Cecair krevis gingiva (GCF) diperoleh daripada 19 orang subjek (pesakit ortodontik) lelaki dan perempuan berusia antara 16 hingga 28 tahun yang menjalani rawatan ortodontik di Klinik Ortodontik Pascasiswazah, Fakulti Pergigian, UKM, Kuala Lumpur. Sampel diambil daripada subjek yang memenuhi kriteria berikut: (1) subjek sihat tanpa sebarang penyakit sistemik, (2) mempunyai kesihatan oral dan periodontium yang memuaskan secara klinikal, (3) tidak mengandung, dan (4) tidak merokok, (5) mempunyai kesesakan ringan hingga sederhana pada arkus maksila dan mandibel yang memerlukan cabutan gigi atas premolar pertama, (6) hubungan kanin II½ atau lebih, (7) hubungan 'incisal' kelas II/1 dengan overjet lebih daripada 6 mm, (8) lebihan gigitan (*overbite*) tidak lebih daripada 50%. GCF diambil hanya setelah memperolehi keizinan bertulis daripada subjek. Kajian ini telah mendapat pengesahan daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan, Universiti Kebangsaan Malaysia. (No:1.5.3.5/244/SPP/DD/030 (1)/2010) yang mendapat pengiktirafan Kementerian Kesihatan Malaysia.

Penyediaan dan pengambilan sampel kajian

Gigi kanin (taring) subjek dikenakan daya ortodontik 1.0 N dan 1.5 N sama ada di bahagian kanan atau kiri arkus maksila yang ditentukan secara rawak. Sampel GCF diambil pada gigi kanin tersebut dengan menggunakan jalur kertas *perio* (Periopaper, Proflow, USA) pada masa-masa tertentu iaitu sebelum memakai pendakap gigi (basal) dan selepas memakai pendakap gigi [minggu 0 (sebelum dikenakan daya) dan minggu 1 hingga minggu 5 (selepas daya diberikan). Sebelum jalur kertas *perio* diletakkan, setiap sulkus gigi kanin yang diuji dikeringkan daripada saliva terlebih dahulu dengan menggunakan gulungan kapas dan penyedut saliva (*sucker*). Sebanyak tiga keping jalur kertas *perio* digunakan pada setiap kali pengambilan sampel GCF. Jalur kertas *perio* ini diselitkan sedalam 1-2 mm ke krevis gingiva satu persatu dan dibiarkan selama 60 saat. Kemudian, jalur kertas *perio* tersebut dimasukkan ke dalam tiub pengempap 1.5 mL yang mengandungi 80 µL salin normal dan 1200 µL *bovine serum albumin* (BSA) berkepekatan 0.01 mg/mL. Selepas itu, tiub yang mengandungi sampel GCF diempap selama 10 minit pada 4°C dengan kelajuan 400 x g untuk mengekstrak GCF daripada

jalur kertas *perio*. Kemudian, sampel tersebut disimpan pada -20°C sehingga dianalisis.

Pengasaan enzim

i. Laktat Dehidrogenase (LDH) dan Aspartat aminotransferase (AST)

Sampel dimasukkan ke dalam campuran yang mengandung penimbal fosfat (0.27 M, pH 7.4), 16.2 mM natrium piruvat, 0.2 mM substrat NADH dan air suling dicampurkan pada jumlah isipadu 250 μL selepas dieram selama 5 minit pada suhu 30°C untuk pengasaan LDH. Campuran dibaca pada panjang gelombang 340 nm dengan menggunakan pembaca mikroplat 96 telaga (Varioskan, Fisher Thermo Scientific) selepas 2 minit.

Bagi pengasaan AST, sampel dieramkan bersama-sama dengan 0.1 M penimbal fosfat (pH 7.4), 0.15 M L-aspartat, 0.4 U malat dehidrogenase, 0.2 mM substrat NADH selama 5 minit pada suhu 30°C . Selepas tamat masa pengeraman, 1 mM oksoglutarat ditambah dan ketumpatan optik (OD) dibaca pada panjang gelombang 340 nm dengan menggunakan pembaca mikroplat 96 telaga selepas 4 minit. Kedua-dua bacaan OD (LDH dan AST) ditukarkan kepada aktiviti enzim yang dinyatakan dalam unit (U). Satu unit bersamaan dengan 1 μmol NADH yang digunakan per minit pada suhu 30°C . Hasil akhir dinyatakan sebagai aktiviti spesifik enzim LDH dan AST. Jumlah aktiviti spesifik LDH dan AST diperolehi dengan membahagikan jumlah aktiviti LDH dan AST (U) dengan jumlah kandungan protein (mg) dan dinyatakan sebagai U/mg.

ii. Asid Fosfatase Rintang Tartrat (TRAP) dan alkali fosfatase (ALP)

Sampel dimasukkan ke dalam medium eraman yang mengandungi 1 mM substrat *p*NPP, 1 M penimbal asetat (pH 5.8), 0.15 M KCl, 1 mM asid askorbik, 0.1 mM FeCl_3 , 1 mM natrium tartrat dan 1% (v/v) triton X-100 dan air suling pada jumlah isipadu 200 μL . Campuran ini kemudian dieram pada suhu 37°C selama satu jam. Selepas satu jam, 0.9 M NaOH ditambah untuk menghentikan tindakbalas enzim ke atas substrat menjadikan jumlah campuran 250 μL . Ketumpatan optik diukur pada panjang gelombang 405 nm bagi pengasaan TRAP.

Bagi pengasaan ALP, sampel dimasukkan ke dalam medium eraman yang mengandungi 1 mM substrat *p*NPP, 0.1 M penimbal karbonat (pH 9.8), 0.02 M manitol dan 0.3 mM MgCl_2 . Kemudian, air suling ditambah untuk menjadikan jumlah campuran 200 μL . Campuran kemudian dieram selama 30 minit pada suhu 30°C . Selepas proses eraman tamat, 4 M NaOH dimasukkan ke dalam campuran tadi untuk menghentikan tindakbalas.

Nilai OD diukur pada panjang gelombang 405 nm. Bacaan purata OD aktiviti TRAP dan ALP ditukarkan kepada aktiviti enzim yang dinyatakan dalam unit (U). Satu unit bersamaan dengan 1 μmol *p*-nitrofenolat yang dibebaskan per minit pada 37°C (TRAP) dan 30°C (ALP). Hasil akhir dinyatakan dalam aktiviti spesifik TRAP dan ALP. Jumlah aktiviti spesifik TRAP dan ALP didapati dengan membahagikan jumlah aktiviti TRAP dan ALP (U) dengan jumlah kandungan protein (mg) dan dinyatakan dalam U/mg.

Asai imunojerapan berpaut enzim (ELISA)

Analisis ELISA dalam kajian ini adalah berdasarkan kepada protokol kit ELISA terapis untuk LDH, AST, TRAP dan ALP daripada Cusabio Biotech Co., China. Pengasaan sampel dan piawai dilakukan secara triplikat. Jumlah protein yang hadir ditentukan dengan membandingkan nilai OD sampel dengan nilai OD pada graf piawai. Graf OD melawan kepekatan piawai untuk setiap enzim diplot dengan menggunakan perisian *Curve Exert* 1.3.

Analisis statistik

Perhubungan di antara aktiviti enzim dan jumlah enzim pula dinilai dengan menggunakan Ujian Korelasi *Pearson*. Nilai *r* dibahagikan kepada tiga julat perhubungan: 0–0.3 (lemah), 0.4–0.7 (pertengahan) dan 0.8–1.0 (tinggi). Ujian statistik ini dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 20 (SPSS Inc., USA).

HASIL DAN PERBINCANGAN

Enzim adalah protein kompleks di dalam badan manusia yang bertindak sebagai pemangkin organik yang dapat mengawal atur serta meningkatkan kadar tindak balas biokimia dalam sel. LDH, AST, TRAP dan ALP masing-masing adalah enzim yang dirembeskan semasa pergerakan gigi semasa rawatan ortodontik yang bertindak sebagai penanda biologi kepada proses inflamasi, kematian sel, penyerapan dan pembentukan tulang. Dalam kajian ini, hubungan diantara jumlah enzim dengan aktiviti spesifik masing-masing dikenalpasti.

Jadual 1 menunjukkan aktiviti spesifik LDH serta jumlah enzim LDH yang hadir semasa rawatan ortodontik dengan daya 1.0 N dan 1.5 N. Jumlah enzim LDH mempunyai korelasi negatif lemah yang tidak signifikan dengan aktiviti spesifiknya dengan daya 1.0 N ($r=-0.28$, $p>0.05$) dan daya 1.5 N ($r=-0.08$, $p>0.05$). Selain itu, jumlah enzim AST serta korelasinya dengan aktiviti spesifik AST ditunjukkan dalam Jadual 2. Jumlah enzim AST mempunyai korelasi negatif sederhana yang tidak signifikan dengan aktiviti spesifiknya dengan daya 1.0 N ($r=-0.49$, $p>0.05$). Selain itu, jumlah enzim

Jadual 1. Aktiviti spesifik dan jumlah enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada basal dan semasa rawatan (minggu 0 hingga 5) dengan daya 1.0 N dan 1.5 N

Daya	1.0 N			1.5 N		
Masa	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim LDH (mIU/mL)	Nilai r	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim LDH (mIU/mL)	Nilai r
Basal	3.08 \pm 0.20	21.03 \pm 4.81		3.08 \pm 0.20	21.03 \pm 4.81	
M0	4.31 \pm 0.40	48.45 \pm 12.98		3.90 \pm 0.41	52.97 \pm 6.23	
M1	4.41 \pm 0.49	66.32 \pm 9.47		4.98 \pm 0.69	45.76 \pm 1.31	
M2	4.54 \pm 0.40	47.53 \pm 8.59	-0.27**	4.85 \pm 0.64	43.60 \pm 14.23	-0.08**
M3	5.27 \pm 0.43	40.81 \pm 17.42		5.39 \pm 0.44	56.57 \pm 15.90	
M4	4.19 \pm 0.32	51.72 \pm 18.02		4.91 \pm 0.50	55.26 \pm 3.00	
M5	3.57 \pm 0.24	49.05 \pm 14.28		4.18 \pm 0.22	55.00 \pm 7.49	

Data menunjukkan aktiviti spesifik, jumlah enzim LDH \pm SEM dan nilai r bagi korelasi diantara aktiviti spesifik LDH dengan jumlah enzim LDH (n=19). ** = tidak signifikan, r = 0-0.3 (lemah); 0.4-0.7 (sederhana); 0.8-1.0 (kuat), mIU/mL= mili-international Unit/mL, M=minggu

Jadual 2. Aktiviti spesifik dan jumlah enzim aspartat aminotransferase (AST) pada basal dan semasa rawatan (minggu 0 hingga 5) dengan daya 1.0 N dan 1.5 N

Daya	1.0 N			1.5 N		
Masa	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim AST (mIU/mL)	Nilai r	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim AST (mIU/mL)	Nilai r
Basal	4.51 \pm 0.76	6.80 \pm 0.58		4.51 \pm 0.76	6.80 \pm 0.58	
M0	6.66 \pm 0.86	5.37 \pm 1.95		6.86 \pm 0.50	8.61 \pm 2.23	
M1	5.58 \pm 0.27	3.04 \pm 0.48		2.98 \pm 0.36	3.08 \pm 0.43	
M2	4.15 \pm 0.93	7.09 \pm 2.51	-0.50**	3.54 \pm 0.35	6.49 \pm 2.90	0.08**
M3	4.05 \pm 1.14	6.64 \pm 3.05		3.20 \pm 0.42	6.60 \pm 3.19	
M4	4.76 \pm 1.22	3.53 \pm 0.75		6.74 \pm 1.07	3.05 \pm 0.26	
M5	5.91 \pm 0.47	4.80 \pm 1.66		6.96 \pm 0.19	5.24 \pm 1.24	

Data menunjukkan aktiviti spesifik, jumlah enzim AST \pm SEM dan nilai r bagi korelasi diantara aktiviti spesifik AST dengan jumlah enzim AST (n=19). ** = tidak signifikan, r = 0-0.3 (lemah); 0.4-0.7 (sederhana); 0.8-1.0 (kuat) mIU/mL= mili-international Unit/mL, M=minggu

Jadual 3. Aktiviti spesifik dan jumlah enzim asid fosfatase rintang tartart (TRAP) pada basal dan semasa rawatan (minggu 0 hingga 5) dengan daya 1.0 N dan 1.5 N

Daya	1.0 N			1.5 N		
Masa	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim TRAP (mIU/mL) [#]	Nilai r	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim LDH (mIU/mL) [#]	Nilai r
Basal	2.49 \pm 0.18	0.32 \pm 0.02		2.49 \pm 0.18	0.32 \pm 0.02	
M0	3.17 \pm 0.87	1.01 \pm 0.28		2.79 \pm 0.09	0.65 \pm 0.20	
M1	2.90 \pm 0.25	0.71 \pm 0.01		3.74 \pm 0.68	0.47 \pm 0.15	
M2	3.43 \pm 0.18	0.96 \pm 0.47	0.02**	4.92 \pm 1.18	0.52 \pm 0.22	0.43**
M3	3.92 \pm 0.43	0.53 \pm 0.20		3.71 \pm 0.94	0.41 \pm 0.12	
M4	3.84 \pm 0.88	0.83 \pm 0.31		3.37 \pm 0.08	0.43 \pm 0.15	
M5	5.35 \pm 2.08	0.59 \pm 0.09		4.48 \pm 1.37	0.76 \pm 0.09	

Data menunjukkan aktiviti spesifik, jumlah enzim TRAP \pm SEM dan nilai r bagi korelasi diantara aktiviti spesifik TRAP dengan jumlah enzim TRAP (n=19). ** = tidak signifikan, r = 0-0.3 (lemah); 0.4-0.7 (sederhana); 0.8-1.0 (kuat), M=minggu

AST dengan daya 1.5 N menunjukkan korelasi positif lemah yang tidak signifikan ($r=0.08$, $p>0.05$) dengan aktiviti spesifiknya. Jadual 3 menunjukkan aktiviti spesifik TRAP dan jumlah enzim TRAP yang hadir. Jumlah enzim TRAP dengan daya 1.0 N menunjukkan korelasi positif lemah dan tidak signifikan ($r=0.016$, $p>0.05$) dengan aktiviti

spesifiknya. Jumlah enzim TRAP dan aktiviti spesifiknya dengan daya 1.5 N pula mempunyai korelasi positif sederhana tetapi tidak signifikan ($r=0.48$, $p>0.05$). Korelasi di antara jumlah enzim ALP dan aktiviti spesifiknya ditunjukkan dalam Jadual 4. Jumlah enzim ALP mempunyai korelasi negatif yang lemah serta tidak signifikan ($r=-0.28$,

Jadual 4. Aktiviti spesifik dan jumlah enzim alkali fosfatase (ALP) pada basal dan semasa rawatan (minggu 0 hingga 5) dengan daya 1.0 N dan 1.5 N

Daya	1.0 N			1.5 N		
Masa	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim ALP (mIU/mL) [#]	Nilai r	Aktiviti spesifik $\times 10^{-8}$ (U/mg)	Jumlah enzim ALP (mIU/mL) [#]	Nilai r
Basal	1.83 \pm 0.25	18.53 \pm 1.20		1.83 \pm 0.25	18.53 \pm 1.20	
M0	1.72 \pm 0.61	22.78 \pm 6.91		1.89 \pm 0.53	13.16 \pm 1.86	
M1	1.58 \pm 0.28	12.53 \pm 2.03		2.34 \pm 0.63	11.02 \pm 1.87	
M2	2.11 \pm 0.78	17.75 \pm 3.21	-0.28**	2.45 \pm 0.64	13.06 \pm 1.96	-0.08**
M3	2.67 \pm 1.34	14.91 \pm 1.81		2.23 \pm 1.18	16.23 \pm 3.08	
M4	2.60 \pm 1.70	11.61 \pm 2.70		3.45 \pm 2.31	15.72 \pm .32	
M5	3.28 \pm 2.03	16.67 \pm 7.32		2.46 \pm 1.33	12.17 \pm 3.46	

Data menunjukkan aktiviti spesifik, jumlah enzim ALP \pm SEM dan nilai r bagi korelasi diantara aktiviti spesifik ALP dengan jumlah enzim ALP (n=19). ** = tidak signifikan, r = 0-0.3 (lemah); 0.4-0.7 (sederhana); 0.8-1.0 (kuat), M=minggu

$p > 0.05$) dengan aktiviti spesifiknya. Selain daripada itu, jumlah enzim ALP dengan daya 1.5 N juga mempunyai hubungan negatif yang lemah dan tidak signifikan ($r = -0.08$, $p > 0.05$). Secara keseluruhannya, tiada korelasi positif yang kuat ($r > 0.8$) di antara jumlah enzim dengan aktiviti spesifiknya dalam GCF dengan daya 1.0 dan 1.5 N bagi kesemua enzim penanda yang dianalisis iaitu, LDH, AST, TRAP dan ALP.

Profil pengekspresan protein ditranslasikan hasil daripada pengaktifan gen menggunakan ELISA tidak memberikan profil yang sama dengan profil aktiviti spesifiknya melalui pengesanan enzim di mana peningkatan aktiviti spesifik enzim tidak menunjukkan peningkatan pada jumlah enzim yang hadir (korelasi negatif lemah dan sederhana; Jadual 1,2 dan 4) atau sebaliknya. Walau bagaimanapun, terdapat peningkatan aktiviti spesifik enzim dan juga peningkatan jumlah enzim tetapi tidak pada semua minggu yang dikaji (korelasi positif lemah; Jadual 3). Selain itu, profil yang tidak menentu juga ditunjukkan oleh jumlah enzim yang terhasil semasa pergerakan gigi di mana jumlah enzim didapati lebih tinggi di awal kajian iaitu pada basal (kawalan; tanpa rawatan) dan minggu 0 (sebelum tekanan diberikan untuk menggerakkan gigi) berbanding dengan aktiviti spesifik enzim (Jadual 2 dan 4). Perbezaan ini menunjukkan bahawa terdapat kombinasi di antara protein aktif dan protein tidak aktif di dalam GCF (Messana *et al.*, 2008). Enzim aktif adalah protein yang mempunyai tapak aktif (*active site*) untuk pengikatan substrat yang membolehkan tindak balas berlaku manakala, enzim tidak aktif mengandungi tapak pengawalan (*regulatory site*) sahaja di mana tindak balas tidak boleh berlaku. Kedua-dua protein aktif dan protein tidak aktif ini terhasil melalui proses modifikasi selepas translasi (*post translational modification*) (PTM) yang mengambil tempat selepas proses translasi semasa sintesis protein. Proses PTM ini termasuk proses metilasi, fosforilasi, penambahan

lipid dan glikosilasi (Seo dan Lee, 2004). Proses PTM protein penting untuk menentukan struktur tertier dan kuarterner protein serta untuk mengawalatur aktiviti dan fungsinya. Menurut Pawson (2002), fosforilasi dan defosforilasi adalah modifikasi terbaik yang terlibat dalam proses berbalik, pengaktifan, pentakaktifan aktiviti enzim dan modulasi interaksi molekul dalam tapak jalan pengisyratan.

Pengesaian enzim mengesan aktiviti spesifik enzim yang aktif sahaja di mana substrat terikat pada tapak aktifnya manakala, analisis ELISA mengesan kehadiran kedua-dua jenis enzim iaitu enzim aktif dan tidak aktif. Ini ditunjukkan oleh profil aktiviti spesifik enzim LDH, AST, TRAP dan ALP dan jumlah enzim masing-masing semasa rawatan dijalankan. Profil peningkatan aktiviti spesifik enzim penanda dari minggu ke minggu rawatan berbeza dengan hasil analisis ELISA di mana apabila aktiviti spesifik enzim meningkat, jumlah enzim menunjukkan peningkatan atau penurunan (Jadual 1-4). Terdapat penurunan jumlah enzim yang dikesan apabila aktiviti spesifik enzim meningkat mungkin disebabkan oleh enzim tidak aktif adalah lebih dominan dan lebih banyak dikesan berbanding dengan enzim aktif manakala, peningkatan jumlah enzim menunjukkan enzim aktif lebih dominan berbanding dengan enzim tidak aktif.

Analisis ELISA dapat mengesan enzim aktif dan tidak aktif kerana ia menggunakan antibodi yang spesifik kepada enzim yang hendak dikaji. Enzim tersebut terikat kepada antibodi spesifik secara terus melalui ikatan kovalen atau ianya dikesan melalui antibodi kedua yang dipautkan (*linked*) kepada enzim melalui biokonjugasi (Thompson, 2010). Biokonjugasi adalah satu proses yang menggandingkan (*coupling*) dua biomolekul dalam rangkaian kovalen (*covalent linkage*). Proses biokonjugasi yang paling biasa adalah penggandingan molekul kecil seperti biotin kepada

protein, atau konjugasi protein ke atas protein seperti konjugasi antibodi ke atas enzim. Molekul lain yang biasa digunakan di dalam biokonjugasi adalah oligosakarida, asid nukleik serta polimer sintetik seperti polietilen glikol (Niemeyer, 2004).

Yamaguchi *et al.* (2006) telah menggunakan analisis ELISA untuk mengenalpasti jumlah interleukin-1 β yang dirembeskan ke dalam GCF semasa pergerakan gigi secara ortodontik. Selain itu, Mah dan Prasad (2004) juga menggunakan analisis ELISA untuk mengesan dentin sialoprotein daripada GCF yang diambil semasa penyerapan akar (*root resorption*) yang disebabkan oleh rawatan ortodontik. Walau bagaimanapun, analisis ELISA dalam kajian ini didapati tidak sesuai digunakan untuk melihat profil enzim LDH, AST, TRAP dan ALP semasa rawatan ortodontik kerana pergerakan gigi adalah satu proses biologi yang aktif dan ia melibatkan enzim yang aktif sahaja. Oleh kerana analisis ELISA akan mengesan kedua-dua enzim aktif dan tidak aktif, ia tidak sesuai untuk digunakan bagi tujuan tersebut.

KESIMPULAN

Tiada korelasi positif yang kuat di antara aktiviti spesifik enzim dengan jumlah enzim yang hadir menunjukkan bahawa enzim di dalam GCF terdiri daripada enzim yang aktif dan tidak aktif. Oleh itu, asai enzim lebih sesuai digunakan berbanding analisis ELISA untuk melihat profil aktiviti enzim penanda yang aktif semasa rawatan ortodontik berdasarkan kepada proses pergerakan gigi yang melibatkan enzim aktif. Pada masa akan datang, profil penanda biologi pergerakan gigi semasa rawatan ortodontik boleh dikaji dengan lebih lanjut dengan menggunakan pendekatan yang lain seperti *Western Blot* dan proteomik.

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh geran penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (DPP-2013-024, DLP-2012-025, DLP-2012-001), Kementerian Pengajian Tinggi (FRGS/1/2011/SG/UKM/02/13, ERGS/1/2012/SKK11/UKM/02/5).

RUJUKAN

- Alfaqaeeh, S.A. & Anil, S. 2011. Lactate Dehydrogenase Activity in Gingival Crevicular Fluid as a Marker in Orthodontic Tooth Movement. *Open Dentistry Journal*, **5**: 105-109.
- Batra, P., Kharbada, O.P., Duggal, R., Singh, N. & Prakash, H. 2006. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during canine retraction. *Journal of Craniofacial Research*, **9(1)**: 44-51.
- Krishnan, V. & Davidovitch, Z. 2006. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics*, **129(469)**: e1-32.
- Mah, J. & Prasad, N. 2004. Dentine phosphoproteins in gingival crevicular fluid during tooth resorption. *European Journal of Orthodontics*, **26(1)**: 25-30.
- Messana, I., Inzitari, R., Fanali, C., Cabras, T. & Castagnola, M. 2008. Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *Journal of Separation Sciences*, **31(11)**: 1948-1963.
- Niemeyer, C.M. 2004. *Bioconjugation Protocols, Analysis and Methods*. Humana Press, New Jersey. vol 287.
- Pawson, T. 2002. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European Journal of Cancer* **38 (Suppl 5)**: S3-S10.
- Paolantonio, M., Di-Placido, G., Tumini, V., Di-Stilio, M., Contento, A. & Spoto, G. 2000. Aspartate aminotransferase activity in crevicular fluid from dental implants. *Journal of Periodontology*, **71**: 1151-1157.
- Perinetti, G., Paolantonio, M., D'Attilio, M., D'Archivio, D., Tripodi, D., Femminella, B., Festa, F., & Spoto, G. 2002. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics*, **122**: 548-556.
- Rohaya, M.A.W., Shahrul Hisham, Z.A. & Khazlina, K. 2008. The activity of Aspartate Aminotransferase during canine retraction (bodily tooth movement) in orthodontic treatment. *Journal of Medical Sciences*, **8(6)**: 553-558.

- Rohaya, M.A.W., Shahrul Hisham, Z.A. & Khazlina, K. 2009. Preliminary study of Aspartate Aminotransferase in gingival crevicular fluids during orthodontic treatment. *Journal of Applied Sciences*, **9(7)**: 1393 - 1396.
- Seo, J. & Lee, K.J. 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systemic approaches. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **37(1)**: 35-44.
- Shahrul Hisham, Z.A., Mohd Faiz, E., Rohaya, M.A.W., Yosni, B. & Sahidan, S. 2010. Profile of lactate dehydrogenase, tartrate resistant acid phosphatase and alkaline phosphatase in saliva during orthodontic tooth movement. *Sains Malaysiana*, **39(3)**: 405-12.
- Stucki, U., Schnid, J., Hammerle, C. & Lang, N. 2001. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. *Clinical Oral and Implant Research*, **12(2)**: 121-127.
- Sugiyama, A., Uehara, A., Matsushita, K., Nakamura, R., Ogawa, T., Sugawara, T.S. & Takada, H. 2002. Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface components of blackpigmented bacteria:mentation of production of interleukin-8, granulocyte colony-stimulation factor and granulocyte-macrophage colony-stimulation factor and expression of intercellular adhesion molecule. *Bacteria Pathogen*, **51**: 27-33.
- Thompson, M. 2010. Immunoanalysis-Part 2: Basic Principles of ELISA. *Analytical Methods Committee*, **45**: 1-2.
- Yamaguchi, M., Yoshii, M. & Kasai, K. 2006. Relationship between substance P and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement in adults. *European Journal of Orthodontics*, **28**: 241-246.
- Yang, Y. & Ma, H. 2009. Western Blotting and ELISA Technique. *Researcher*, **1(2)**: 67-86.

